

Sete Lagoas, MG
Novembro, 2010

Autores

Luciano Viana Cota¹
Rodrigo Vêras da Costa¹
Eng. Agr., Fitopatologia.
Embrapa Milho e Sorgo.
Cx. P. 151. 35701-970,
Sete Lagoas, MG.Paulo E. Guimarães²
Lauro J. M. Guimarães²
Sidney Netto Parentoni²
Cleso A. Patto Pacheco²
Eng. Agr., Melhoramento
Genético. Embrapa Milho
e Sorgo. Cx. P. 151.
35701-970, Sete Lagoas,
MG.Dagma D. da Silva³
Pós-doutoranda
Fapemig/Embrapa Milho
e Sorgo. Cx. P. 151.
35701-970, Sete Lagoas,
MG.Douglas Ferreira Parreira⁴
⁴Doutorando Universidade
Federal de Viçosa. CEP.
36570-000. Viçosa, MG.

Métodos de inoculação de *Colletotrichum graminicola* em colmo de milho

Introdução

A antracnose causada pelo fungo *Colletotrichum graminicola* (Ces.) G.W. Wils. é uma das principais doenças do milho em todo o mundo (BERGSTROM; NICHOLSON, 1999). A doença afeta todas as partes da planta, entretanto, é comumente constatada no campo nas formas de mancha foliar e de podridão do colmo. O patógeno pode sobreviver em restos de cultura ou em sementes, na forma de micélio e conídios. O ciclo de vida de *C. graminicola* pode ser dividido em cinco fases: produção e dispersão do inóculo primário nos restos culturais da cultura anterior, lesões foliares nas plântulas, manchas foliares com produção de inóculo secundário, colonização sistêmica com podridão do colmo e sobrevivência nos restos culturais (BERGSTROM; NICHOLSON, 1999). O patógeno é capaz de colonizar os tecidos do colmo antes da fase reprodutiva, em plantas vigorosas. Nesse caso, os danos diretos são causados pela colonização dos tecidos vasculares do colmo, reduzindo a absorção de água e de nutrientes. Como consequência, há um menor enchimento dos grãos, que resulta em um menor tamanho e em um menor peso deles, levando, em alguns casos, à morte prematura da planta (COSTA et al., 2008).

Antes da década de 1970, a antracnose do milho não era considerada uma doença importante na cultura do milho. Contudo, a partir daquele ano começaram a ocorrer surtos epidêmicos nas regiões produtoras do centro-norte dos Estados Unidos (HOOKER; WHITE, 1976; PERKINS; HOOKER, 1979). Uma epidemia severa da antracnose no Estado de Indiana levou-o a não mais produzir milho-doce (WARREN et al., 1973). Os plantios sucessivos, a adoção do sistema de plantio direto sem a utilização da rotação de culturas e a utilização de genótipos suscetíveis são fatores que contribuem para o aumento da ocorrência da doença em função da elevada capacidade do patógeno de sobreviver em restos de cultura, resultando no rápido acúmulo de inóculo nas áreas de cultivo. A antracnose do colmo pode reduzir o peso de espigas e de grãos em até 34% (COTA et al., 2009).

O uso de cultivares resistentes constitui-se na principal medida de manejo da doença. Medidas culturais, como a rotação de culturas, o uso de adubação equilibrada, principalmente com relação a N e K, e espaçamento e densidade de plantas adequadas são importantes como medidas complementares ao uso de cultivares resistentes. Não existem fungicidas registrados no Ministério da Agricultura para o manejo de podridões de colmo na cultura do milho, e os resultados de pesquisa são contraditórios quanto ao efeito direto desses produtos em patógenos localizados na base do colmo. No processo de identificação de novas fontes de resistência à antracnose do colmo, em estudos de variabilidade patogênica de *C. graminicola*, na avaliação da eficiência de medidas de manejo e da epidemiologia da doença, é fundamental o desen-

volvimento e a padronização de metodologias que permitam a seleção segura dessas fontes de resistência e a determinação precisa da reação, de resistência ou de suscetibilidade, dos genótipos avaliados. Um fato que exemplifica bem a necessidade de padronização de métodos de inoculação foi o trabalho realizado por Forgey et al. (1978). O autor apontou a ocorrência de oito raças de *C. graminicola* em 10 isolados do patógeno inoculados em 10 linhagens de milho. Entretanto, Nicholson e Warren (1981) repetiram suas avaliações utilizando sete isolados e as mesmas linhagens utilizadas por Forgey, e concluíram que as diferenças nos sintomas, causados pelos diferentes isolados, não eram suficientes para permitir a sua diferenciação em raças, atribuindo os resultados obtidos por Forgey à não padronização da metodologia de preparo de inóculo e de inoculação.

Para estudos envolvendo patógenos de colmo na cultura do milho, os métodos de inoculação normalmente utilizados são: injeção de suspensão de esporos no colmo, inserção de palito previamente imerso em solução de esporos do patógeno e inserção de palito previamente colonizado pelo patógeno (BERGSTROM; NICHOLSON, 1999; BORGES et al., 2001; MUNKVOLD et al., 1997).

Considerando-se a inexistência de métodos padronizados de inoculação e de avaliação da reação de colmos de milho a *C. graminicola*, os objetivos deste trabalho foram determinar o método mais eficiente e prático para a inoculação deste patógeno em colmos de plantas de milho e determinar o momento adequado para avaliação da severidade dos sintomas após a inoculação artificial.

Material e Métodos

1. Avaliação de métodos para inoculação de *C. graminicola* em colmos de plantas de milho

Os ensaios foram conduzidos em casa de vegetação do Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo, CNPMS – EMBRAPA, em Sete Lagoas – MG. Foram utilizadas quatro cultivares de milho: BRS1010 (Embrapa),

DKB390 (Monsanto), 2B710 (Dow Agrosience) e 30F35 (Pioneer). As plantas foram cultivadas em vasos de 20 litros mantidos em casa de vegetação. Foram semeadas quatro sementes por vaso, sendo mantida apenas uma planta por vaso após o desbaste, realizado 15 dias após o plantio. Foram utilizados seis vasos de cada genótipo para cada método de inoculação, e quatro plantas de cada genótipo utilizadas como testemunhas (sem inoculação). As adubações de plantio e de cobertura foram realizadas de acordo com as análises de solo e a necessidade da cultura. Na fase do pré-pendoamento, as três folhas baixas de cada planta foram removidas (folha e bainha), expondo-se os três entrenós da base do colmo (Figura 1a), os quais foram desinfestados superficialmente com álcool 70% (Figura 2a) antes das inoculações, realizadas conforme os métodos descritos abaixo. Para as inoculações foi utilizado o isolado 16.04M de *C. graminicola* depositado na coleção de fitopatógenos da cultura do milho da Embrapa Milho e Sorgo.



Figura 1. Validação das metodologias selecionadas. A) plantas com as folhas baixas retiradas para a inoculação; B) parcela 30 dias após inoculação, com as folhas retiradas e os colmos cortados abaixo da espiga; C) parcela encaminhada para avaliação; D) colmos do híbrido seccionados verticalmente; E) testemunha à esquerda das demais plantas que foram inoculadas.

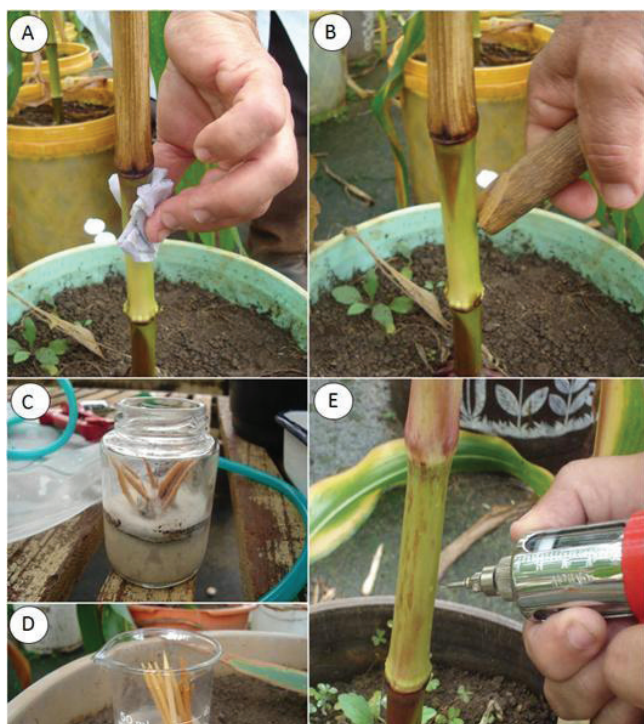


Figura 2. Metodologias de inoculação da antracnose em colmos de plantas de milho. A) limpeza efetuada no entrenó de inoculação com álcool 70%; B) perfuração do colmo com furador para os tratamentos com o depósito de palito; C) palitos recobertos por micélio fúngico; D) palitos imersos em suspensão de esporos; E) inoculação feita com injeção de esporos.

Obtenção do isolado, preparo do inóculo e inoculação

O isolado de *C. graminicola* foi transferido para placas de Petri contendo o meio FAA (60g farinha de aveia, 15g Agar e 1000ml água) e mantidas sob luz fluorescente contínua. Após cinco dias de crescimento, realizou-se uma raspagem superficial do micélio para indução da esporulação do fungo. Para produção do inóculo, o isolado foi novamente repicado para placas contendo meio FAA e realizados os mesmos procedimentos para a obtenção de placas contendo esporulação suficiente para o preparo do inóculo. Cinco dias após a raspagem, as placas foram inundadas com água destilada e raspadas superficialmente, para a liberação de esporos. A suspensão de esporos obtida foi ajustada para a concentração de 10^6 conídios/mL, através da contagem dos esporos em câmara de Neubauer.

Foram avaliados três métodos de inoculação: palito imerso na suspensão de esporos (PISE), palito colonizado por micélio do patógeno (PCMP) e injeção da suspensão de esporos (ISE).

Os palitos a serem utilizados nas inoculações foram previamente fervidos por duas vezes em água deionizada para a eliminação de quaisquer resíduos, sendo feita a troca de água nas duas fervuras. Os palitos foram secos em estufa a 60° C e, posteriormente, acondicionados em beakers para autoclavagem. A utilização posterior dos palitos autoclavados foi variada em função do método de inoculação.

Para o método de inoculação com palito colonizado por micélio do fungo (PCMP), o inóculo foi produzido da seguinte maneira: palitos, previamente esterilizados, foram inseridos em meio FAA vertido em um recipiente de vidro com tampa de rosca previamente autoclavados (Figura 1C). Em seguida foi realizada a repicagem do isolado do patógeno para cada recipiente e, os mesmos, mantidos em câmara de incubação para promover o crescimento do micélio do fungo nos palitos.

No método PISE e PCMP, após a desinfestação superficial, o segundo entrenó da base do colmo foi perfurado com o auxílio de um furador de diâmetro similar ao diâmetro dos palitos (Figura 1b). Após a retirada do furador, os palitos, embebidos na suspensão de esporo (PISE) ou colonizados pelo patógeno (PCMP), foram colocados no orifício produzido, sendo inserido, aproximadamente, 1/3 do seu comprimento. As testemunhas consistiram da inserção de palitos livres do patógeno, ou seja, não imersos na suspensão de esporos e sem micélio do patógeno. No método ISE, após a desinfestação superficial do colmo com álcool 70%, foi injetado aproximadamente 0,5 mL da suspensão de esporos no segundo entrenó do colmo, com o auxílio de uma seringa de uso veterinário (Fig. 1e). Após a deposição do inóculo, e retirada da agulha, o orifício produzido foi obstruído utilizando-se uma cola acética de silicone. As testemunhas receberam injeção de água.

Avaliações

As avaliações foram realizadas 30 dias após as inoculações. Para tal, segmentos de colmos das plantas foram colhidos e avaliados em condição de laboratório. Na colheita, foram removidas todas as folhas das plantas, e os segmentos de colmos compreendidos entre o primeiro entrenó e o entrenó de inserção da espiga foram cortados e levados ao laboratório para as avaliações (Figura 1). Os segmentos de colmo foram seccionados longitudinalmente e a extensão das lesões (severidade) foi avaliada utilizando-se a escala diagramática utilizada por Christensen e Wilcoxson (1966), adaptada para a antracnose do colmo. Essa escala é composta de quatro notas de avaliação, sendo 1 até 25% do tecido do entrenó necrosado, 2 de 26 a 50% do tecido necrosado, 3 de 51 a 75% do tecido necrosado e 4, 76 a 100% do tecido necrosado. Foram avaliadas todas as plantas de cada tratamento e obtidas as notas médias de severidade e o desvio padrão para cada tratamento.

2. Determinação da época de avaliação da severidade da antracnose do colmo do milho após as inoculações.

Este experimento foi conduzido com o objetivo de avaliar a possibilidade de se reduzir o tempo de avaliação da podridão do colmo após a inoculação. O ensaio foi conduzido em casa de vegetação do Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo, CNPMS – EMBRAPA, em Sete Lagoas – MG. Foram utilizadas três cultivares de milho: BRS1001 (Embrapa), 2B710 (Dow Agrosience) e Attack (Syngenta). As plantas foram cultivadas conforme descrito no item 01. As inoculações foram realizadas quando as plantas estavam na fase de pré-pendoamento, utilizando-se o método do palito imerso na suspensão de esporos do mesmo isolado utilizado no experimento anterior. As avaliações foram realizadas 5, 10, 15, 20, 25 e 30 dias após as inoculações. Foram utilizadas doze repetições para cada tratamento e cada parcela foi constituída de um vaso. As avaliações foram realizadas seguindo-se a mesma metodologia adotada no ensaio de avaliação de métodos de

inoculação. Foi considerada a melhor época de avaliação aquela que permitiu a melhor distinção das cultivares com relação ao nível de resistência à antracnose do colmo.

3. Validação do método de inoculação e do período de avaliação em condições de campo.

Com o objetivo de testar a eficiência, a operacionalidade e a praticidade do método de inoculação com palito imerso na suspensão de esporos foi conduzido um experimento de campo utilizando-se 10 cultivares de milho e 10 isolados de *C. graminicola*. O ensaio foi conduzido em condição de campo na área experimental da Embrapa Milho e Sorgo. As 10 cultivares de milho testadas foram: BRS1010 (Embrapa), BRS1030 (Embrapa), BRS1035 (Embrapa), DKB390 (Dekalb), 2B710 (Dow Agrosience), 2B587 (Dow Agrosience), 30F80 (Pioneer), 30P70 (Pioneer), Trakktor (Syngenta) e Attack (Syngenta). O plantio foi realizado utilizando-se o espaçamento de 0,9 metros entre linhas. Para cada cultivar foram semeadas 10 linhas de três metros, sendo cada linha destinada à inoculação com um isolado. Em cada linha, foram inoculadas 15 plantas e três utilizadas com testemunha (palito sem esporos). Foram utilizados 10 isolados de *C. graminicola*: 155.04M, 16.04M, 150.09M, 152.09M, 132.09M, 14.04M, 114.09M, 130.09M, 6.08M e 37.09M, depositados na coleção de fungos fitopatogênicos da Embrapa Milho e Sorgo. Os procedimentos de preparo de inóculo, inoculação e avaliações foram realizados conforme descrito no item 1.

Resultados e Discussão

Todos os métodos de inoculação testados foram eficientes em reproduzir os sintomas da podridão do colmo nas cultivares de milho (Tabela 01). O método de inoculação com palito imerso na suspensão de esporos foi considerado o melhor devido ao seu menor custo, à maior facilidade e à rapidez em relação aos outros métodos de inoculação, e por permitir uma fácil padronização da inoculação. Este método resultou em uma menor variabilidade das notas de severidade entre as repetições, representado por um menor desvio padrão da estimativa das médias dos tratamentos (Tabela 01). Este método é mais fácil de ser

utilizado quando um número grande de isolados e genótipo necessitam ser avaliados, uma vez que reduz a chance de contaminação entre os isolados e permite um maior número de pessoas realizarem as inoculações.

Tabela 01. Severidade de antracnose em colmos de quatro genótipos de milho (2B710, DKB390, 30F35 e BRS1010) inoculados com *Colletotrichum graminicola* utilizando-se três métodos de inoculação: palito imerso na suspensão de esporos (PISE), palito colonizado por micélio do patógeno (PCMP) e injeção da suspensão de esporos (ISE). Os valores entre parênteses representam o desvio padrão (DP) da estimativa da nota média.

Método	Genótipo	Nota (DP)	Método	Genótipo	Nota (DP)
PCMP	2B710	1,61 (1,29)	ISE	2B710	2,06 (1,06)
	DKB 390	2,42 (0,90)		DKB 390	3,22 (0,69)
	30F35	3,08 (0,81)		30F35	2,56 (0,91)
	BRS 1010	3,21 (0,68)		BRS 1010	3,21 (1,07)
DPM*		0,92	0,94		
PISE	2B710	2,14 (1,21)			
	DKB 390	2,93 (0,81)			
	30F35	3,61 (0,72)			
	BRS 1010	3,31 (0,70)			
DPM		0,86			

* Desvio padrão médio

O método de palito colonizado por micélio, apesar de eficiente, apresentou dificuldade na inoculação devido à perda de rigidez dos palitos causada pela colonização do fungo. Esse fato dificultou o processo de inserção do palito no entrenó perfurado. O método da injeção da suspensão de esporos apresentou o inconveniente da dificuldade na padronização da quantidade de inóculo a ser injetada, variando entre os aplicadores. Além disso, nas situações em que for necessária a utilização de um maior número de isolados, a necessidade de limpeza do conjunto de aplicação para a troca de isolados torna o processo trabalhoso, demorado e com mais chance de contaminações. Portanto, os métodos de palito colonizado por micélio e da injeção da suspensão de esporos apresentaram limitações para o uso em inoculações em larga escala, com um grande número de isolados e genótipos a serem avaliados.

Assim como para os métodos de inoculação, a melhor época para avaliação da severidade da antracnose do colmo, após a inoculação, foi

aquela que permitiu uma melhor distinção entre os genótipos avaliados. Com base neste critério, a avaliação realizada aos 30 dias após a inoculação foi considerada a mais eficiente (Figuras 3 e 4).

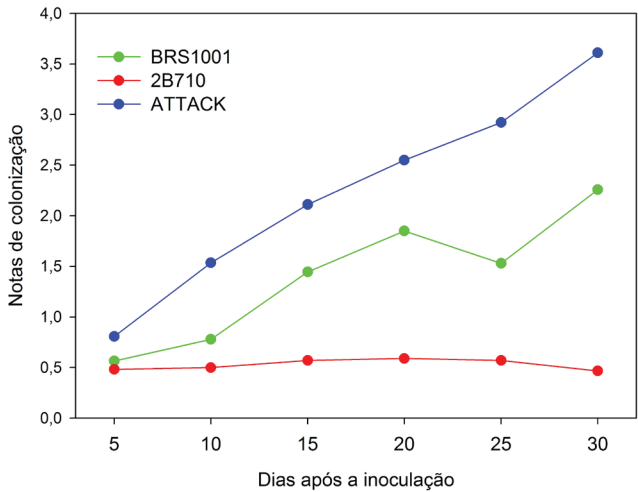


Figura 3. Curvas de progresso da severidade da antracnose (*Colletotrichum graminicola*) do colmo em três cultivares de milho avaliadas 5, 10, 15, 20, 25 e 30 dias após a inoculação.



Figura 4. Sintomas da colonização de colmos de milho inoculados com *Colletotrichum graminicola* e avaliados 5, 10, 15, 20, 25 e 30 dias após a inoculação em três cultivares de milho (BRS1001, ATTACK e 2B710).

Os sintomas de podridão nos colmos inoculados puderam ser observados a partir do 15º dia após a inoculação (Figura 04). No entanto, a melhor distinção entre os níveis de resistência ou suscetibilidade dos genótipos foi obtida no 30º dia após a inoculação. Comparando-se as cultivares BRS1001 (moderadamente resistente) e ATTACK (altamente suscetível), observou-se que 30 dias após a inoculação o colmo da cultivar suscetível apresentava-se completamente colonizado pelo patógeno (Figura 4).

Nos ensaios de validação da metodologia de inoculação de *C. graminicola* em colmos de milho, o método de inoculação com palito imerso na suspensão de esporos foi prático e de fácil utilização em condições de campo. Todos os isolados infectaram os colmos inoculados e não houve contaminação na testemunha não inoculada. Os resultados obtidos em condições de campo corroboram os obtidos em casa de vegetação (Figura 5) e reforçaram o potencial deste método para uso em programas de melhoramento visando a fenotipagem de linhagens e para estudos onde um número grande de isolados necessita ser inoculado.

Conclusões

O melhor método para a inoculação de *C. graminicola* em colmos de milho foi o de inoculação com palito imerso na suspensão de esporos do patógeno. Para fins de caracterização da resistência ou suscetibilidade dos genótipos, a melhor época para avaliação foi 30 dias após a inoculação. Este método apresenta um grande potencial para ser utilizado para a inoculação de outros patógenos causadores de podridões de colmo em plantas de milho, como *Fusarium spp.* e *Stenocarpella spp.*

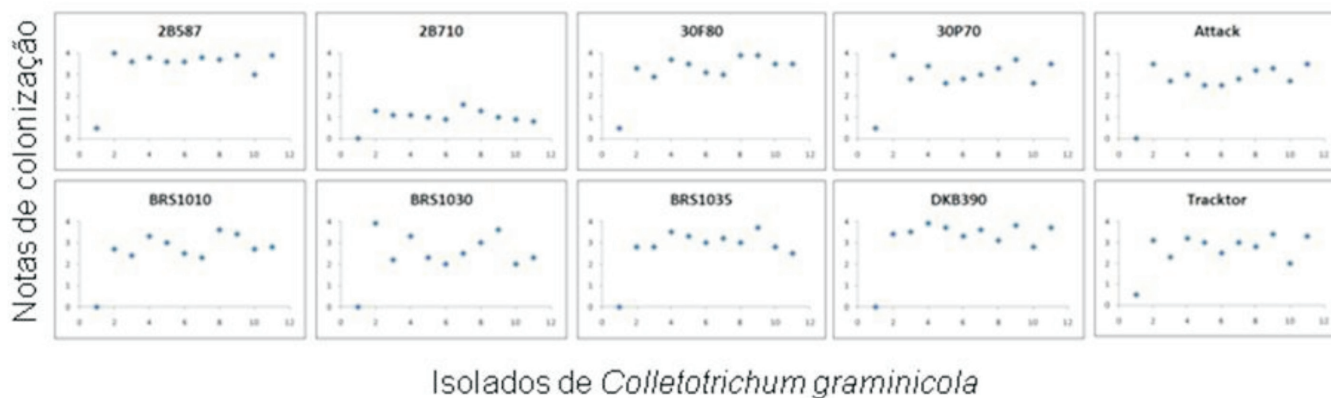


Figura 5. Dispersão da média de colonização do colmo de genótipos de milho por 10 isolados de *Colletotrichum graminicola* (155.04M, 16.04M, 150.09M, 152.09M, 132.09M, 14.04M, 114.09M, 130.09M, 6.08M e 37.09M). O primeiro ponto representa a testemunha.

Referências

- BERGSTROM, G. C.; NICHOLSON, R. L. The biology of corn anthracnose: knowledge to exploit for improved management. **Plant Disease**, St. Paul, v. 83, p. 596-608, 1999.
- BORGES, M. F.; RESENDE, M. L. V.; VON PINHO, R. G. Inoculação artificial de colmos de milho em diferentes idades e concentrações de inóculo e sua relação com a expressão da resistência a *Fusarium moniliforme*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, p. 715-720, 2001.
- CHAMBERS, K. R. Effect of time of inoculation on Diplodia stalk and ear rot of maize in South Africa. **Plant Disease**, St. Paul, v. 72, p. 529-531, 1988.
- CHRISTENSEN, J. J.; WILCOXSON R. D. **Stalk rot of corn**. Saint Paul: The American Phytopathological Society, 1966. 59 p.
- COSTA, R. V.; FERREIRA, A. S.; CASELA, C. R.; SILVA, D. D. **Podridões fúngicas de colmo na cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2008. 8 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular técnica, 100).
- COTA, L. V.; COSTA, R. V.; CASELA, C. R.; LANZA, F. E. **Efeito da podridão de colmo, causada por *Colletotrichum graminicola*, na produção da cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2009. 5 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular técnica, 120).
- FORGEY, W. M.; BLANCO, M. H.; LOEGERING, W. Q. Differences in pathological capabilities and host specificity of *Colletotrichum graminicola* on *Zea mays*. **Plant Disease Reporter**, Beltsville, v. 62, p. 573-576, 1978.
- HOOKE, A. L.; WHITE, D. G. Prevalence of corn stalk rot fungi in Illinois. **Plant Disease Reporter**, Beltsville, v. 60, p. 1032-1034, 1976.
- MUNKVOLD, G. P.; MCGEE, D. C.; CARLTON, W. M. Importance of different pathways for maize kernel infection by *Fusarium moniliforme*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 87, p. 209-217, 1997.
- NICHOLSON, R. L.; WARREN, H. L. The issue of races of *Colletotrichum graminicola* pathogenic to corn. **Plant Disease**, v. 65, p. 143-145, 1981.
- PERKINS, J. M.; HOOKER, A. L. The effects of anthracnose stalk rot on corn yields in Illinois. **Plant Disease Reporter**, St. Paul, v. 63, p. 26-30, 1979.
- WARREN, H. L.; NICHOLSON, R. L.; ULLSTRUP, A. J.; SHARVELLE, E. G. Observations of *Colletotrichum graminicola* on sweet corn in Indiana. **Plant Disease Reporter**, St. Paul, v. 57, p. 143-144, 1973.

Circular Técnica, 137

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Milho e Sorgo
Endereço: Rod. MG 424 km 45 - Caixa Postal 151
Fone: (31) 3027-1100
Fax: (31) 3027-1188
E-mail: sac@cnpmembrapa.br

1ª edição
1ª impressão (2010): 200 exemplares

Comitê de publicações

Presidente: Antônio Carlos de Oliveira
Secretário-Executivo: Elena Charlotte Landau
Membros: Flávio Dessaune Tardin, Eliane Aparecida Gomes,
Paulo Afonso Viana, João Herbert Moreira Viana, Guilherme
Ferreira Viana e Rosângela Lacerda de Castro

Expediente

Revisão de texto: Antonio Claudio da Silva Barros
Normalização bibliográfica: Rosângela Lacerda de Castro
Editoração eletrônica: Tânia Mara Assunção Barbosa